



FI 000102906B



**SUOMI-FINLAND**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

**(12) PATENTTIJULKAIKU  
PATENTSKRIFT**

**(10) FI 102906 B**

**(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats** **15.03.1999**

**(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6**

**C 12M 1/00, C 12Q 1/68  
B 03C 1/00, 1/26, B 01L 3/02  
// G 01N 33/543, C 12N 11/00**

**(21) Patentihakemus - Patentansökaning** **980399**

**(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag** **23.02.1998**

**(24) Alkupäivä - Löpdag** **23.02.1998**

**(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig** **15.03.1999**

**(73) Haltija - Innehavare**

1. Bio-Nobile Oy, PL 36, 20521 Turku, (FI)

**(72) Keksijä - Uppfinnare**

1. Korpela, Matti, Maijamäentie 13, 21100 Naantali, (FI)

**(74) Asiamies - Ombud: Turun Patenttititoimisto Oy, PL 99, 20521 Turku**

**(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning**

**Menetelmä ja väline aineen siirtämiseksi  
Förfarande och medel för transport av ett ämne**

**(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer**

EP A 687505 (B 03C 1/28), JP A 4052202 (engl. tiivistelmä), US A 4649116 (C 12M 1/00),  
US A 3985649 (B 01D 35/06), WO A 94/18565 (G 01N 33/543), WO A 90/15666 (B 03C 1/00),  
WO A 96/12960 (G 01N 33/543), WO A 87/05536 (B 03C 1/00), WO A 86/06493 (G 01N 33/553),  
WO A 92/04961 (B 01D 35/06), WO A 95/00247 (B 03C 1/00)

**(57) Tiivistelmä - Sammandrag**

Keksinnön kohteena on menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan. Mikropartikkeliit ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkeliit on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen. Mikropartikkeliit, joihin entsyytti tai nukleotidisekvenssi tai vastaava on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkeliit magneetin vaikutuksesta. Magneetin pinta erotetaan mikropartikkeliista ohuen venyvä kalvon avulla.

Uppfinningen gäller en metod för att från ett kärl till ett annat kärl förflytta ett enzym, speciellt ett enzym som skall användas i molekylbiologin, eller en nukleotidsekvens, varvid enzymet eller nukleotidsekvensen immobiliseras vid mikropartiklar. Mikropartiklarna består av ett material, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, eller mikropartiklarna har fästts vid ett stycke, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras. Mikropartiklarna, vid vilka enzymet eller nukleotidsekvensen eller motsvarande immobiliseras, infångas med hjälp av en i det första kärllet nedsänkt magnet, magneten med de infångade mikropartiklarna förflyttas till det andra kärllet, och mikropartiklarna befrias från magnetfältets verkan. Magnetens yta åtskiljs från mikropartiklarna med hjälp av en tunn tänjbar membran.

Keksinnön kohteena on menetelmä immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi, menetelmään pohjautuva entsyym tai nukleotidisekvenssin annostelujärjestelmä sekä menetelmässä käytettävä siirtolaite. Keksintö koskee myös menetelmän soveltamista molekyylibiologian alalla.

#### TEKNIIKAN TASO

Molekyylibiologiassa suoritettavissa menetelmissä, joissa manipuloidaan DNA:ta tai RNA:ta käytetään hyväksi restriktioentsyymejä ja DNA/RNA modifioivia entsyymejä. Näiden entsyymien käytöllä on keskeinen merkitys lähes kaikessa molekyylibiologian alueella tapahtuvassa työskentelyssä. Molekyylibiologian laboratorioissa yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat restriktioentsyymit. Nämä entsyymit ovat mahdollistaneet alueella tapahtuneen valtaisan kehityksen. Restriktioentsyymit tunnistavat erittäin tarkasti DNA:n nukleiinihapposekvenssin, jonka ne pilkkovat. Tunnistusalue on erityinen emäsjärjestys DNA:ssa, jonka restriktioentsyymi tunnistaa. Nämä emäsjärjestykset ovat yleensä 4-8 emästä pitkiä. Katkaisupaikka on tarkka kohta DNA:ssa ja yleensä tunnistuskohdan sisällä. Esimerkiksi restriktioentsyymi EcoRI tunnistaa spesifisesti DNA:ssa olevan emäsjärjestyksen:

...5' -G A A T T C-3' ...

...3' -C T T A A G-5' ...

Restriktioentsyymi EcoRI katkaisee lisäksi tarkasta kohdasta tunnistusalueen sisältä DNA ketjussa olevan guaniinin(G) ja adeniinin (A) välillä olevan sidoksen:

...5' -G-3'        5' -A A T T C-3' ...

...3' -C T T A A-5'        3' -G-5' ...

Tarkat restriktioentsyymien DNA-ketjun tunnistusominaisuus

det ja katkaisukohdat ovat ne tärkeät ominaisuudet, jotka ovat tehneet restriktioentsyyymeistä niin hyödyllisen ja tarpeellisen työkalun molekyylibiologeille. Restriktioentsyyjejä tunnetaan jo noin 1000 erilaista ja kaupallisestikin on saatavilla yli 200 erilaista.

Restriktioentsyymin käyttäminen molekyylibiologian soveltuksissa on lähinnä rutiinityöskentelyä ja useissa tapauksissa näiden entsyymien käyttämiseen liittyy työläitä välivaiheita. Hyvä esimerkki on tarvittavat toimenpiteet restriktioentsyymin aktiivisuuden poistamiseksi niiden käytön jälkeen. Monille restriktioentsyyymeistä tarvitaan fenoliuutos niiden inaktivoimiseksi käytön jälkeen. Fenoliuutokset ovat erittäin työläitä ja tekijän kannalta hyvin epämiellyttäviä toimenpiteitä. Lisäksi näissä uutoksissa syntyy runsaasti ongelmajätettä. Useille restriktioentsyymeille kaupalliset valmistajat ehdottavat kuumakäsittelyä entsyymien inaktivoimiseksi, mutta käytännössä käyttäjät usein suorittavat fenoliuutoksen varmistaakseen entsyymin inaktivoitumisen. Kuumennuskäsittelyn jälkeen entsyymin aktiivisuudesta saattaa olla vielä jäljellä useita prosenteja. Koska restriktioentsyyjejä ei ole voitu poistaa nykyään tunnetuilla tekniikoilla, on ongelma ratkaistu entsyymin inaktivoimisella, esimerkiksi kuumakäsittelyllä tai fenoliuutoksella. Toinen epäkohta on se, että käytettyä, kallista entsyyymiä ei voida käyttää uudelleen. Vähemän aikaa vieviä, mutta muuten ongelmallisia ovat erilaiset spin-kolonnit DNA:n puhdistamiseksi reaktioliuoksesta. Näiden kolonniiden käyttö on erittäin kallista eivätkä ne toimi läheskään kaikkien entsyymien poistamiseksi DNA:n joukosta. Tässäkään tapauksesssa poistettua entsyyymiä ei voida käyttää uudelleen.

Fenoliuutoksen käyttäminen monien muidenkin molekyylibiologian alueella yleisesti käytettävien nk. DNA/RNA modifioivien entsyymien inaktivoimiseksi on tarpeellista. Esimerkkeinä voidaan mainita CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) ja Proteinaasi K.

Restriktioentsyymin kanssa työskenneltäessä täytyy huoleh-  
tia myös monista muista käyttöä rajoittavista tekijöistä.  
Eräs keskeinen restriktioentsyymin ominaisuus on nk. star-  
aktiivisuus, jolla tarkoitetaan restriktioentsyymin ominai-  
suutta pilkkoa DNA:ta epätarkasti eli ei-halutuista kohdis-  
ta. Yksi tähän restriktioentsyymin ominaisuuteen vaikutta-  
va tekijä on glyserolin määrä reaktioseoksessa. Kaupalliset  
restriktioentsyymit toimitetaan yleensä liuoksenä, joka  
sisältää 50 % glyserolia. Glyserolin käyttötarkoitus on  
estää entsyymliuosta jäätymästä -20 °C pakkasäilytyk-  
sessä. Normaalikäytössä restriktioentsyyymejä lisätään  
reaktioon hyvin pieniä määriä, jopa alle 1 ul:n määriä. Jos  
glyserolipitoisuus reaktioseoksessa nousee liian korkeaksi,  
aiheuttaa se monissa tapauksissa suuren ongelman juuri  
edellä mainitun star-aktiivisuuden esiintymisenä. Tämä  
rajoittaa useita molekyylibiologisia aplikaatioita restriktioentsyymin käytön suhteeseen. Toinen merkityksellinen  
seikka on se, että reaktioseoksen kokonaistilavuus tulee  
pyrkiä pitämään mahdollisimman pienenä, jotta entsyyymiak-  
tiivisuus olisi kyllin nopea. Nämä kaksi edellä mainittua  
asiaa vaikuttavat suoraan siihen, että tämänhetkisillä  
kaupallisilla restriktioentsyympäivityksillä ei voida  
suorittaa kovinkaan joustavasti suurta restriktioentsyy-  
mpäivityksellä vaativia reaktioita. Kaupallisesti saatavat  
restriktioentsyymit toimitetaan yleensä yhdessä tai enin-  
tään kahdessa vakiopitoisuudessa (U/ml). Haluttaessa lisätä  
paljon restriktioentsyympäivityksellä reaktioon kasvaa glyserolin/li-  
uoksen osuus reaktiossa liiaksi. Tuloksena saadaan helposti  
star-aktiivisuutta ja reaktiokinetiikka on merkittävästi  
hidastunut. Glyserolin poistamiseksi ennen annostelua ei  
ole esitetty keinoja.

Perinteisesti restriktioentsyympäivityksellä on laaja käyttöalue  
DNA:n pilkkomisessa halutuista kohdista esimerkiksi geenien  
kloonaamisessa plasmidivektoreihin. Restriktioentsyymin  
käytölle löytyy jatkuvasti uusia sovelluksia. Esimerkkinä  
voidaan mainita genomien karttoitusprojektit (esim. Human  
Genome Project), AFLP, RFLP, mutaatioiden määritykset ja

erilaiset DNA/RNA:n monistusmenetelmät (esim. Inverse PCR). Restriktioentsyymejä tarvitaan menetelmissä pilkkomaan tutkittava DNA-materiaali aluksi pienemmiksi paloiksi, joista myöhemmin voidaan määrittää esimerkiksi yksityiskohainen emäsjärjestys (sekvenointi). RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) -tekniikassa käytetään myös hyväksi restriktioentsyymejä niiden spesifisyyden takia. RFLP -tekniikassa saadaan restriktioentsyymikäsittelyn jälkeen tutkittavasta DNA:sta ns. sormenjälki. Tätä tekniikkaa käytetään laajasti muun muassa isyyystutkimuksissa, rikostutkimuksissa, epidemiologisissa tutkimuksissa ja mutaatioiden määritysessä. Nämä esimerkit kuvaavat restriktioentsyymien käyttöä sovelluksissa, joiden automatisoinnin tarve on suuri. Tässä keksinnössä kuvatun menetelmän etuja on magneitoitavaan materiaaliin immobilisoitujen restriktioentsyymien huomattavasti helpompi soveltuuus automatisoituihin määrityskiin verrattuna ei-immobilisoituihin restriktioentsyymeihin.

Patenttkirjallisuuden mukaan on myös ehdotettu valmisteita, joissa restriktio- ja vastaavia molekyylibiologiassa käytettäviä entsyymejä on immobilisoitu kiinteään kantaan. Kansainvälisessä patentijulkaisussa WO 92/15674 on ehdotettu sekä restriktioentsyymien että DNA/RNA modifioivien entsyymien immobilisointia kalvoon, joka koostuu polymeerista tai lasikuidusta. US 4,342,833 kuvaaa myös immobilisoituja restriktioentsyymejä, joissa kiinteänä kantajana käytetään CNBr aktivoitua agarosia. Yleisesti magneettipartikkeliä käytetään entsyymien immobilisoinnissa on kuvattu patentijulkaisussa US 4,698,302, joskin tässä patentijulkaisussa ei ollut mainintaa molekyylibiologian alueella käytettävistä entsyymistä. Magneettipartikkeliä erottaminen mainitussa patentijulkaisussa tehtiin perinteisesti ulkopuolisen magneetin avulla.

Perinteinen magneitoitavan materiaalin sitominen reaktioastian sisäseinämään reaktioastian ulkopuolisen magneetin luoman magneettikentän vaikutuksesta ei sovellu hyvin

pienten (10-200  $\mu$ l) liuostilavuuksien käsitteelyyn. Patenttikirjallisuudessa on esitetty useita erilaisia magnetoitavaan materiaalin erotusvälineitä. Kansainvälisessä patentijulkaisussa WO 87/05536 on esitetty erotusväline, jossa muovisen holkin sisällä liikkuvalla kestomagneetilla voidaan magnetoitavaa materiaalia siirtää astiasta toiseen. Suomalaisissa patenttijulkaisuissa (FI 8605002, FI 9503669, FI 9701665, FI 9701666, FI 9701667 ja FI 9701668) on kuvattu samaten erilaisia kestomagneetin käyttöön perustuvia menetelmiä siirtää magnetoitavaa materiaalia astiasta toiseen. Patenttijulkaisuissa US 4272510, US 4649116 ja US 4751053 on kuvattu sähkömagneetin käyttöön perustuvia magneettisen materiaalin siirtoja lähinnä RIA ja EIA-määritysissä. Missään edellä mainituista julkaisuista ei kuvata menetelmää molekyylibiologisissa menetelmissä ongelmallisten asioiden ratkaisemiseksi. Mainituissa patenttijulkaisuissa ei myöskään mainita immobilisoitujen restriktioentsyyymien tai DNA/RNA:ta modifioivien entsyyymien käytöstä.

Magnetoitavat partikkelim kehitettiin 1970-luvun alussa erityisesti entsyyymien immobilisointiin. Tämä teknologia tuli hyvin suosituksi muun muassa immunomääritysissä. Magnetoitavien partikkeliä käytämisellä immunomääritysissä sitoutuneen antigeni-vasta-aine kompleksin erottamiseksi vapaasta fraktiosta tarjosi merkittävän edun sekä reaktionopeudessa että erottuksen käytännöllisydessä. Pääasiallinen kehitys magnetoitavien partikkeliä hyväksikäytössä on viimeisten vuosien aikana tapahtunut solubiologian ja immunokemian alueilla.

Reaktioliuoksessa olevat magneettipartikkelim, joihin biologinen aine, esimerkiksi solut tai vasta-aine on sidottu, on reaktion jälkeen astian ulkopuolisen magneetin avulla vangittu tiettyyn kohtaan, jolloin liuos on mahdollista poistaa ilman että magneettiset partikkelim seuraavat mukana. On myös yritetty immobilisoida molekyylibiologiassa käytettäviä entsyymejä magneettipartikkaleihin.

Yllä kuvattua teknologiaa ei ole kuitenkaan pystytty soveltamaan molekyylibiologian alalla. Partikkeleiden vangitseminen on hyvin ongelmallista pienenten nestetilavuuksien takia. Solubiologian ja immunokemian alalta tunnettu tekniikka ei sovellu molekyylibiologian alalle, koska tällä alalla käytettävät nestemääräät ovat erittäin pieniä, eli suuruusluokkaa 10 - 100  $\mu$ l, kun vastaavat määräät immunokemian alalla ovat usein millilitran suuruusluokkaa ja solubiologian alalla tyypillisesti 10 - 100 ml.

#### KEKSINNÖN TARKOITUS

Tämä keksintö tähtää muun muassa molekyylibiologian menetelmissä ja sovelluksissa käytettävien entsyyymien helppokäyttöisyyden lisäämiseen ja kalliiden entsyyymien uudelleenkäyttöön.

Tämän keksinnön tarkoituksena on poistaa edellä tunnetun tekniikan ongelmat ja aikaansaada uusi menetelmä ja siihen käytettävät siirtovälineet ja järjestelmät mikropartikkeleihin immobilisoitujen, molekyylibiologiassa käytettävien entsyyymien tai nukleotidisekvenssien siirtämiseksi reaktioastiaan ja sieltä pois.

Tarkoituksena on erityisesti aikaansaada menetelmä, jolla mikropartikkeleihin immobilisoitu restriktio- tai muu molekyylibiologian alueella käytettävä entsyyymi voidaan siirtää entsyymin annosteluastiasta reaktioastiaan, ja poistaa reaktiossa käytetty entsyyymi ja ottaa se talteen reaktioastiaasta.

Tarkoituksena on myös aikaansaada menetelmä, jolla immobilisoitu entsyyymi voidaan pesulla vapauttaa glyserolista tai vastaavasta reaktiota haittavasta aineesta ennen kuin se viedään reaktioastiaan.

Tarkoituksena on myös aikaansaada mikropartikkeleihin immobilisoidun entsyymin annostelu-, pesu- ja talteenotto-

järjestelmä, jonka avulla ennalta määritetyn entsyyymimääärän annostelu reaktioastiaan ja talteenottaminen sieltä on helposti automatisoitavissa.

Tarkoituksena on myös aikaansaada siirtoväline, jonka avulla mikropartikkelit, joihin entsyyymi tai nukleotidisekvenssi on sidottu, on helposti vangittavissa ja vapautettavissa uudelleen.

Tarkoituksena on lisäksi aikaansaada tehokkaimpia DNA:n pilkkomisreaktioita ja muita molekyylibiologisia reaktioita yllä mainitun menetelmän avulla.

#### KEKSINNÖN KUVAUS JA SUOSITELTAVAT SUORITUSMUODOT

Keksinnön tunnusmerkit ilmenevät patenttivaatimuksista.

Keksinnön kohteena on siten menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettäväni entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan. Keksinnölle on tunnusomaista, että mikropartikkelit ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkelit on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen ja että mikropartikkelit, joihin entsyyymi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkelit magneetin vaikutuksesta.

Keksinnön mukainen menetelmä ei rajoitu molekyylibiologian alaan, vaan se on yleisesti sovellettavissa aloilla, joilla käsitellään pieniä tilavuuksia.

Entsyymi on sopivasti restriktioentsyyymi, modifioiva entsyyymi tai jokin muu molekyylibiologiassa käytettävä entsyyymi. Esimerkkeinä DNA/RNA modifioivista entsyyymeistä voidaan mainita: Proteinaasi K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline

Phosphatase), E. Coli alkaline phosphatase, eksonukleaaasit (esimerkiksi P1 nukleaasi, S1 nukleaasi), ribonukleaaasit, RNAasit (esim. Pacreatic RNAasi, RNAasi H, RNAasi T1, RNAasi M, RNAasi T2), DNA ligaasit, RNA ligaasit, DNA polymeraaasit, Klenow entsyyymi, RNA polymeraaasit, DNA kinaasit, RNA kinaasit, terminal transferaasit, AMV reverse transcriptase ja fosfodiesteraaasit. Näiden ja muiden DNA/RNA modifioivien entsyyymien käyttö on erittäin monimuotoista sekä molekyylibiologian tutkimuksessa että sovelluksissa.

Nukleotidisekvenssi voi olla mikä tahansa yksi- tai kaksisäikeinen nukleotidisekvenssi, ja on erityisesti DNA, RNA, mRNA tai cDNA.

Entsyymin tai nukleotidin immobilisointi mikropartikkeleihin tarkoittaa sitä, että entsyymi tai nukeotidisekvenssi on kiinnitetty partikkeleiden pintaan tai että se on vangittu "häkkimäisen" partikkelin sisään, kuitenkin niin, että ympäröivä liuos pääsee kosketukseen sen kanssa.

Käsite "mikropartikkeli" tarkoittaa tässä yhteydessä hyvinkin pieniä partikkeleita, joiden koko suositeltavasti on alueella 0.1-10  $\mu\text{m}$ . Mikropartikkeli, johon entsyymi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, voi olla magneettista tai magnetoitavissa olevaa materiaalia. Toisen vaihtoehdon mukaan itse mikropartikkeli, johon aine on immobilisoitu, voi olla ei-magneettinen. Tässä tapauksessa mikropartikkeli on kiinteästi liitetty toiseen kappaleeseen, joka on magneettista tai magnetoitavissa olevaa materiaalia.

Entsyymin tai nukleotidin kiinnittäminen mikropartikkeleihin voidaan tehdä kovalenttisen sidoksen avulla, esimerkiksi kantajassa olevien amino- tai hydroksiryhmien avulla. Vaihtoehtoisesti sitominen voidaan aikaansaada bioafiniteettiparin, esimerkiksi biotiini/streptavidiini -parin avulla. Erään tavan mukaan immobilisoitava entsyyymi tuotetaan rekombinantti-DNA-teknologialla esimerkiksi Esche-

richia coli bakteerissa ja entsyyymiin on tehty erityinen affineettihäntä. Tämä affineettihäntä sitoutuu mikropartikkeleihin, joihin on sopivasti kiinnitetty kyseiseen affineettihäntään voimakkaasti sitoutuva komponentti. Affineettihäntä voi olla pienimolekyylinen yhdiste tai proteiini. Tällaisella järjestelyllä halutun entsyymin puhdistamisessa voitaisiin tehokkaasti käyttää hyväksi mikropartikkeleita ja samalla mikropartikkeliin sitoutunut entsyymi olisi valmiiksi immobilisoitu mikropartikkelin pinnalle käytettäväksi keksinnössä kuvattussa menetelmässä.

Entsyymin tai nukleotidisekvenssin kiinnittäminen mikropartikkeleihin voi myös olla epäspesifinen, ei-koalenttinen, kuten adsorptio. Esimerkinä voidaan mainita DNA:n suora kiinnittymisen lasipintaan.

Käsite "magneettinen tai magnetisoitavissa oleva materiaali" kattaa paramagneettiset ja superparamagneettiset materiaalit. Erityisen sopiva partikkelimateriaali on jokin superparamagneettinen materiaali. Superparamagneettiset partikkelit muodostavat ulkopuolisen magneettikentän vaikutuksesta itsellensä magneettikentän, joka katoaa kun ulkopuolin magneettikentä katoaa. Täten partikkelit pysyvät erillisinä eivätkä saostu, mikä on edullista niiden käytön kannalta. Magnetippartikkeleita (para- ja superparamagneettisia) valmistavat monet kaupalliset yritykset (Bangs Laboratories Inc., Dynal A.S, Advance Magnetics Inc., Scipac Limited, Pael-Lorei, CPG Inc.). Valittavissa on eri kokoisia sekä eri tavoin valmiiksi aktivoituja magneetipartikkeleita. Myös monin eri tavoin modifioituja magneetipartikkeleita on saatavilla. Esimerkkeinä voi mainita karboksyili- ja amino-modifioidut magneetipartikkelit. Yleensä magnetiitti on sidottu polymeeriseen kantajaan kuten esimeriksi lateksi ja sellulloosa. CPG Inc. valmistaa magneetipartikkeleita, joiden materiaali on huokoinen lasi. Kaikissa edellä mainituissa magneetipartikkeleissa on pieniä (1-20 nm) magnetittikiteitä dispersoitu polymerin/lasin joukkoon, joka sitten on polymeroitu ja loppudu-

loksena on magnetoitava partikkeli. Bangs Laboratries Inc. valmistaa magneettipartikkeleita, joissa magnetiittia on kontrolloidusti ainoastaan partikkelien ytimessä. Tämä on tärkeää siksi, että rautaa ei saa vapautua reaktioliuokseen monissa molekyylibiologian sovelluksissa kuten esimerkiksi PCR reaktiossa. Liuokseen vapautunut rauta inhiboi reaktion kulkua PCR reaktiossa.

Magneetti, jonka avulla partikkelit vangitaan, voi olla joko kestomagneetti tai sähkömagneetti.

Erään suositeltavan suoritusmuodon mukaan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä magneetti on kestomagneetti tai sähkömagneetti, jonka pinta on erotettu mikropartikkeleista erillisen kalvon avulla. Kun kestomagneetti upotetaan astiaan mikropartikkeleiden vangitsemiseksi (eli kun magneetti lähennetään kalvoa kohti) kerääntyvät mikropartikkeliit kalvon pintaan. Magneetti ja kalvoon kertyneet mikropartikkelit viedään sen jälkeen toiseen astiaan ja siinä viedään kestomagneetti kalvosta poispäin, jolloin mikropartikkelit vapautuvat heikentyneen magneettikentän johdosta. Sähkömagneetin tapauksessa magneettipartikkeliit keräystapahtumassa luodaan magneettikenttä ja magneettipartikkeliit irrottamiseksi magneettikenttä pysäytetään.

Keksinnön kohteena on myös mikropartikkeleiden vangitsemiseksi ja vapauttamiseksi soveltuva siirtoväline. Siirtovälineelle on tunnusomaista, että se käsittää varsiosan, ja sen päässä olevan magneetin, sekä kalvon, joka erottaa magneetin mikropartikkeleista, mutta joka ei ollenaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaan magneettikenttää.

Oleellista on se, että vietäessä siirtoväline nesteeseen tarkoituksena kerätä liuoksessa olevat magneettipartikkelit, saatetaan siihen magneetikenttä niin, että magneettipartikkeliit kerääntyvät luodun magneettikentän vaikutuksesta siirtovälineen läheisyyteen.

Magneettipartikkeliit eivät keräydy suoraan metallisen magneetin pintaan vaan magneetin ympärillä olevan suojakalvon ympärille. Suojakalvo on edullisimmin häirimäisen ohut suojakerroks magneetin päällä/ympärillä saattäen näin mahdollisimman suuren magneettikentän voimakkuuden liuokseen. Suojakalvo voi olla erityinen (kiinteästi, pysyvästi) magneetin ympärillä oleva inertti kerros kalvon muodostavaa ainetta esimerkiksi teflonia, silaania tms. Erityisesti tämä tapaus tulee kyseeseen käytettäessä sähkömagneettia. Suojakalvo voi olla taipuisa ja mahdollisesti myös venyvä, mutta se voi vaihtoehtoisesti olla holkkityyppinen, joustamattomasta materiaalista, esimerkiksi joustamattomasta polymeeristä valmistettu kerros, joka ei ole pinnoitteena tapaan kiinteässä yhteydessä magneettiin. Suojakalvo voi olla vielä venytetty, jolloin kalvon paksuus pienenee ja magneettikenttä voimistuu mikropartikkeliien keräystapahtumassa. Keksinnön mukaisella siirtovälineellä voidaan erittäin pienien kesto- tai sähkömagneetin avulla suorittaa mikropartikkeliien siirtoja pienissä astioissa olevista pienistä nestetilavuuksista.

Keksinnön mukainen siirtoväline ja annostusjärjestelmä on esitetty tarkemmin seuraavissa piirustuksissa, joissa

Kuvio 1 esittää eksinnön mukaista, kestomagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä aksiaalisuuntaisena leikkauskuvantona, jossa magneetti on partikkeleita vapauttavassa asennossa,

Kuvio 2A esittää kuvion 1 siirtovälinettä magneetin ollessa partikkeleiden keräysasennossa,

Kuviot 2B ja 2C esittävät kuvioiden 1 ja 2A yksityiskohtia suurennettuina,

Kuvio 3 esittää kuvion 1 siirtovälinettä sivulta,

Kuviot 4A-4C esittävät kestomagneetin käyttöön pohjautuvaa

siirtovälinettä toisen suoritusmuodon mukaan,

Kuviot 5A-5F esittävät sähkömagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä kolmannen suoritusmuodon mukaan, ja

Kuvio 6 esittää keksinnön mukaista annostelu- ja pesujärjestelmää.

Kuvioissa 1 - 3 on esitetty siirtoväline 10, joka soveltuu entsyyymiä tai nukleotidisekvenssiä sitovien mikropartikkeleiden vangitsemiseen ja uudelleen vapauttamiseen. Putkimaisessa runko-osassa 11 on aksiaalisuunnassa edestakaisin liikuteltavissa oleva tanko 17, joka toimii magneetin 18 kiinnitysvartena. Magneetti 18 on tässä ratkaisussa kesto-magneetti ja tanko 17 voi olla magneettisesti johtavaa materiaalia. Runko-osan 11 päässä on kärkikupu 20, jonka pohja 21 on kalvomaista materiaalia. Magneetin 18 pinta 22 on painettavissa kalvoa 21 vasten, jolloin mikropartikkelit 25 kiinnittyvät kalvoon 21 (kuviot 2A ja 2B). Mikropartikkelit irtoavat, kun magneettia 18 liikutetaan poispäin kalvosta 21 (kuvio 1 ja 2C).

Kuvion 1 viitenumero 12 on runko-osan 11 sisällä liikuva, sormella käytettävä painin. Painimen 12 lukitussalpa on esitetty viitenumerolla 13. Painimeen vaikuttaa ylöspäin vaikuttava palautusjousi 14. Painin liikuttaa välitystankoa 15, johon on kiinnitetty välitysjousi 16. Välitysjousen toiseen päähän on kiinnitetty magneetin kiinnitystanko 17. Runko-osan yhteyteen on myös sovitettu vipu 19, jonka avulla siirtovälineen alapäähän painettu kärkiosa 20 on poistettavissa siirtovälineen rungosta. Kun mikropartikkelit on siirretty haluttuun astiaan, voidaan irroittaa kärkiosa 20. Välitysjousen 16 tehtävänä on joustaa, kun magneetti 18 osuu kärkiosan 20 pohjaan 21. Tällä tavalla varmistetaan välyksetön kosketus magneetin pinnan 22 ja kalvon 21 välille, jolloin saadaan mikropartikkelit mahdollisimman voimakkaan magneettivuon vaikutukseen. Lisäksi jousi 16 voi kompensoida rakenneosien väliset valmistukses-

ta ja asennoinnista johtuvat pienet mittavaihtelut.

Yllä kuvattu siirtoväline voidaan tehdä em. periaatekonstruktion mukaisesti vaihdellen osien sijaintia, geometriaa ja materiaaleja sen mukaan kuin ergonomia eri työskentelyasennoissa ja -olosuhteissa vaatii.

Kuvioissa 4A-4C nähdään kestomagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä toisen suoritusmuodon mukaan. Tangon 17 päähän on kiinnitetty kestomagneetti 18. Tanko 17 ja siihen kiinnitetty magneetti on nuolien mukaisesti liikkuvasti järjestetty tankoa ympäröivässä putkimaisessa kiinteässä katteessa 23. Katteen päässä on aukko 24, jonka läpi magneetti 18 on työnnettäväissä. Siirtovälineen kärkiosan ympärille on sovitettu kalvo 21, joka on kiinnitetty katteeseen 23 pidikkeen 26 avulla. Kuviossa 4A magneetti 18 on mikropartikkeleita vapauttavassa asennossa ja kuvioissa 4B ja 4C magneetti 18 on mikropartikkeleita vangitsevassa asennossa. Kuviossa 4B magneetti 18 sijaitsee aivan kiinteän katteen 23 päässä. Magneetti 18 on tiukassa kontaktissa suojakalvon 21 kanssa. Kuvion 4C ratkaisussa magneetti 18 on työnetty selvästi ulos katteen 23 aukosta 24. Tässä tapauksessa suojakalvo 21, joka on venyvä materiaalia, on selvästi venynyt ja magneetti on tiukassa kontaktissa kalvon 21 kanssa. Tanko 17 ja kate 23 on valmistettu sopivasta materiaalista, esimerkiksi muovista. Katteen 23 avulla saadaan haluttaessa magneettikenttä kohdistetuksi aivan siirtovälineen kärjen päähän. Aukon 24 ansiosta magneetti saadaan siirrettyä partikkeleiden keräyksen kanalta edulliseen asentoon. Kuviossa 4C on esitetty mahdollisuus kerätä mikropartikkelit pienen kestomagneetin (esim. tilavuus < 50  $\mu$ l) ja ohuen, venyvän kalvon 21 avulla. Katteen, tangon ja magneetin muodon ja kalvon avulla on myös mahdollista vaikuttaa kalvon ulkомуotoon erityisesti mikropartikkeleiden keräys- ja siirtotapahtumaa ajatellen. Haluttaessa esimerkiksi terävähkö ulkoluoto, voidaan muuttaa magneetin ja tangon koon suhde. Katteen 23 muodolla ja sijainnilla magneetin suhteen on myös saavutettavissa

monipuolisia vaihtoehtoja.

Kuviot 5A-5F esittävät sähkömagneetin käyttöön pohjautuvaa siirtovälinettä. Sähkömagneetin 18 kärki on merkitty numerolla 18' ja sen runko numerolla 18''. Kuviossa 5A nähdään ratkaisu, jossa sähkömagneetin kärki ja runko ovat vapaina ilman erityistä kiinteää katetta, ja kuviossa 5B nähdään ratkaisu, jossa kärki 18' ja runko 18'' on suojattu kiinteän katteen 23 avulla. Kuvio 5C esittää kuvion 5A välineen kärkiosaa ja kuvio 5D esittää tätä samaa kärkiosaa suojakalvon 21 ympäröimänä. Kuvion 5A siirtovälineen runko 18'' ja kärkiosa 18' voidaan pinnoittaa sopivalla pinnoitteella ja valita pinnoitteen hydrofobisuus tai hydrofiilisuus sopivasti sovelluksen mukaan. Kuvion 5A kärkiosa voidaan myös jälkipinnoittaa yhden tai useamman kerran. Kuvion 5C ratkaisussa, jossa kärkiosalla ei ole erillistä suojakalvoa, on kärki pestävä ennen välineen uudelleen käyttöä. Tämä on helposti hoidettavissa esimerkiksi automaattisessa laitteessa, jossa on pesuasema. Kuvion 5C kärkiosa voidaan jälkipinnoittaa monia kertoja tarpeen mukaan. Kuvion 5D ratkaisussa suojakalvo pidetään kiinnitetynä pidikkeen 26 avulla. Suojakalvon ohuudesta johtuen sähkömagneetin kentän voimakkuus on hyvä. Sopivasti muotoillaen kärkiosaa 18' voidaan välinettä käyttää pienissä tilavuuksissa.

Kuvion 5B kiinteä kate 23 voidaan valmistaa eri materiaaleista, esimerkiksi ei-ferromagneettisesta materiaalista kuten muovista, ja katteen muotoa voidaan vaihdella. Kate 23 ei peitä sähkömagneetin kärkeä 18'. Tämän ratkaisun kärkiosa voi olla ilman erillistä kalvoa (kuvio 5E) tai varustettu erillisellä suojakalvolla 21 (kuvio 5F). Kuvion 5E ratkaisussa kärkiosa voidaan pinnoittaa sopivasti valitulla pinnoitteella (vrt. kuvion 5C kärkiosa). Kuvion 5E magneettikärki 18' ja kate 23 voidaan pinnoittaa toisistaan poikkeavasti. Sähkömagneetin kärki 18' voidaan myös pinnoittaa useamman kerran. Kärkiosa on pestävä ennen välineen uudelleen käyttöä ja tämä on helposti hoidettavissa esimerkiksi automaattisessa laitteessa (vrt. kuvio 5C). Kuvion 5F

ratkaisussa kärkiosa on suojakalvon 21 ympäröimänä (pidike merkitty numerolla 26). Suojakalvon ohuudesta johtuen sähkömagneetin kentän voimakkuus on hyvä. Sopivasti muotoillaan kuvioiden 5E ja 5F kärkiosia voidaan välinettä käyttää pienissä tilavuuksissa. Muuttamalla katteen 23, magneettikärjen 18' ja suojakalvon 21 suhteita toisiinsa voidaan tuntuvasti vaikuttaa partikkeleiden keräysominaisuuksiin.

Kuviossa 6 on esitetty mikropartikkeleihin immobilisoidun entsyymin annostelu- ja pesujärjestelmä. Järjestelmä käsitteää levyn 30, jossa on reagenssikuoppia 31, jotka sisältävät annosteltavan määrän mikropartikkeleita, joihin entsyymi on sidottu, ja mahdollisesti tarvittavat säilytysaineet. Levyssä on lisäksi pesunestekuoppia 32, jotka sisältävät sopivan pesunesteen, johon reagenssikuopasta nostettu mikropartikkelimäärä on upotettavissa pesua varten. Reagenssikuopat 31 ja pesunestekuopat 32 on sopivasti järjestetty vierekkäisiin riveihin. Annostelu on helposti automatisoitavissa tällä järjestelmällä. Partikkeleiden siirtoväline viedään ensin reagenssikuoppaan 31, josta kerätään koko siihen annosteltu mikropartikkelimäärä. Haluttaessa voidaan ottaa suurempi määrä immobilisoitua entsyyymiä reaktioon keräämällä haluttu määrä entsyyymiä useammasta kuoasta 31. Sen jälkeen siirtoväline siihen kiinnitettyine mikropartikkeleineen viedään tarvittaessa pesunestekuoppaan 32 tai suoraan reaktioastiaan. Pesun tarkoituksena on poistaa entsyyymien säilytysliuoksesta mahdollisesti mukaan tullut glyseroli tai muu reaktiossa epäsuotuisasti vaikuttava aines entsyymivalmisteesta. Pesun jälkeen mikropartikkelit viedään reaktioastiaan. Levyssä 30 voi myös olla erillisiä pesunestekuoppia 33, jotka sisältävät sopivan pesunesteen, jolla voidaan pestää reaktioastiasta siirretyn mikropartikkelin. Levyssä 30 voi lisäksi olla isompia kuoppia eli jatkosäilytysastioita 34, joihin viedään mikropartikkelit kuopissa 33 tapahtuneen pesun jälkeen.

Edellä kuvattu siirtoväline ja levy 30 voivat yhdessä

muodostaa automaattisen laitteen pääkomponentteja. Siirtovälineitä voi laitteessa olla useitakin ja ne voivat olla kytkettyjä robottiin, joka ohjaa niiden toiminnan prosessin vaativien olosuhteiden mukaisesti.

#### KEKSINNÖN SOVELLUKSET

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu DNA:n pilkkomiseen restriktioentsyymin avulla, sekä muidenkin molekyylibiologisissa menetelmissä/sovelluksissa käytettävien entsyymien käyttöön. Mikropartikkeleihin immobilisoitu entsyyymi siirretään reaktioastiaan, jossa entsymaattisen reaktion annetaan tapahtua halutun ajan. Reaktion jälkeen siirretään mikropartikkeliit ja niihin sidottu entsyyymi pois reaktioasta. Näin immobilisoidun entsyymin inaktivointia ei tarvitse suorittaa. Käytetyt immobilisoidut entsyymit siirretään pesukuoppaan, jossa mahdolliset epäpuhtaudet reaktioseoksesta pestään pois. Pestyt immobilisoidut entsyymit siirretään keräysastiaan tai muuhun erityisesti niille varattuun astiaan niiden uudelleenkäyttöä odottaamaan.

Restriktioentsyyvikäsittelyn jälkeen voidaan reaktioastiaan siirtää esimerkiksi mikropartikkeleihin immobilisoitu CIAP-entsyymi (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) tai jokin muu valitussa sovelluksessa tarvittava immobilisoitu entsyyyi. Niiden käyttämisessä sovelletaan edellä kuvattua menetelmää saavuttaen samoja etuja kuin immobilisoitujen restriktioentsyymien tapauksessa.

Koska käytetyt entsyymit voidaan siirtää pois, saadaan entsyymien inaktivoimisvaihe poistettua kokonaan. Samalla menetelmä on huomattavasti yksinkertaisempi ja nopeampi kuin perinteinen entsyymien inaktivoiminen. Kaaviossa 1 esitetystä vertailusta yksinkertaisen restriktioentsyyymi-CIAP-käsittelyn tapauksessa nähdään, että uudessa menetelmässä lukuisat vaiheet ovat jäneet pois tarpeettomina.

Kaaviossa 2 on esitetty keksinnön sovellutus DNA:ta pilkko-vien ja/tai modifioivien entsyyymien kierrätyksessä ja käsittelyssä.

Keksinnön avulla on aikaansaatu menetelmä, jossa mikropartikkeleihin immobilisoitua proteaasia (esimerkiksi Proteinaasi K) voidaan käyttää inaktivoimaan mikä tahansa haluttu entsyyymi reaktioastiasta. Proteinaasi K on erittäin yleinen ja paljon käytetty entsyyymi. Valitettavasti tämä entsyyymi on erittäin stabiili ja vaatii tehokkaan inaktivinnin (fenoliuutos). Kuvatun keksinnön mukaisesti Proteinaasi K:ta voidaan käyttää ja poistaa erittäin tehokkaasti reaktioastiasta. Toinen käyttötapa immobilisoidulle Proteinaasi K:lle on sen käyttäminen minkä tahansa liuoksessa olevan entsyyymiaktiivisuuden poistamiseksi. Tällaisessa käyttömuodossa immobilisoitu Proteinaasi K täydentää keksinnön etuja yleisenä entsyyymien inaktivointitoimenpiteenä. Tällainen käyttötapa on erittäin hyödyllinen esimerkiksi tapauksissa, joissa inaktivoitavaa entsyyymiä ei kyötä saattamaan immobilisoitavaan muotoon, inaktivoitava entsyyymi on epäpuhtautena reaktiossa tai haluttaessa varmistaa ehdoton entsyyymien inaktivoituminen reaktioseoksessa. Immobilisoitu Proteinaasi K täydentää keksinnön laajamittaisen käytön molekyylibiologian sovelliukseissa.

Keksinnön mukaisen menetelmän avulla voidaan ottaa entsyyymi talteen reaktioseoksesta uudelleenkäyttöä varten. Menetelmän avulla voidaan myös siirtää entsyyymi annosteluastiasta reaktioseokseen. Haluttaessa voidaan viedä magneetin avulla vangitut mikropartikkeliit pesunesteesseen glyserolin tai muun stabilointiaineen poispesemiseksi ennen kuin mikropartikkeliit viedään reaktioseokseen. Pesuastiassa mikropartikkeliit voidaan tarvittaessa vapauttaa magneettikentästä, jolloin partikkeliit pääseväät vapaaksi ja pesu tehostuu.

Keksinnön kohteena olevan, ohuella kalvolla suojatun magneettisen siirtovälineen avulla saavutetaan etuja myös muissakin sovelliukseissa kuin immobilisoitujen entsyyymien

käytössä. Sovelluksia, joissa magnetoitavaa materiaalia käytetään, ovat esimerkiksi DNA:n puhdistus, RNA:n puhdistus, mRNA:n puhdistus, sekvenointi, affiniteettipuhdistus, cDNA kirjastojen valmistaminen, DNA/RNA koettimien valmistus, DNA/RNA koettimien leimaus, DNA/RNA hybridisaatiot, PCR menetelmät, ligaasi -amplifikaatiomenetelmät ja monistetun (esimerkiksi PCR) DNA:n määritys.

Keksintö soveltuu pienien tilavuuksien käsitteilyyn magnetoitavan materiaalin kanssa. Saatettaessa magneetti (suoja-kuorella varustettu) liuokseen saavutetaan suuria etuja magnetoitavan materiaalin keräystapahtumaan perinteiseen verrattuna. Erityisesti on huomioitava se, että tässä tapauksessa magneettipartikkelit voidaan yksinkertaisesti siirtää liuoksesta pois. Perinteisessä tavassa magneettipartikkelit jäivät reaktioastiaan ja liuos dekantoitiin pois. Saatettaessa magneetti liuokseen on magneetin ja magneettipartikkeliin etäisyys lyhyempi verrattuna ulkopuolisen magneetin käyttöön. Samaten liuospintaan jäävien magneettipartikkeliin, pintajännityksestä johtuen, keräys on tehokkaampaa saatettaessa magneetti liuokseen. Ongelmasi tässäkin tapauksessa muodostuu pienien liuostilavuuksien käsitteily ja myös riittävän tehokkaan magneetikentän synnyttäminen. Ulkopuolin magneetti voi olla kuinka suuri tahansa ja samalla hyvin voimakas kerätäkseen suhteellisen pienetkin magnetoitavat partikkelit reaktioastian sisäseinämään. Magneetin koolle on suuret rajoitukset toimittaessa pienissä astioissa ja pienissä liuostilavuuksissa. Magneetikentän voimakkuus on verrannollinen magneetin kokoon ja kerättävän magnetoitavan materiaalin etäisyyteen. Suuria magneettipartikkeleita ( $10-100 \mu\text{m}$ ) voidaan kerätä suhteellisen heikoillakin magneeteilla kun taas erittäin pieniä ( $< 0.05 \mu\text{m}$ ) magneettipartikkeleita voidaan kerätä vain erityisten high-gradient magneettien avulla. Käytännön sovelluksissa esimerkiksi molekyylibiologian alueella toimitaan  $0.1-10 \mu\text{m}$  läpimittaisten magneettipartikkeliin kanssa. Yleensä on edullista käyttää mahdollisimman pieniä magneettipartikkeleita, koska muun muassa niiden sitomiska-

pasiteetti ja reaktiokineettiset ominaisuudet ovat suuret verrattuna suurempien magneettipartikkeleihin. Pienikokoinen magneetin avulla kyötäänkin yleensä keräämään suhteellisen suuria magneettipartikkeleita, koska magneettikentän ja etäisyyden välillä on voimakas riippuvuus eli magneettikenttä heikkenee nopeasti etäisyyden kasvaessa.

Konkreettisina esimerkkeinä keksinnön sovelluksista molekyylibiologian alalla voidaan mainita:

1. DNA inserttien kloonaus:

Restriction enzymes (esim. EcoR I, Hind III, Bam HI, Pst I, Sal I, Bgl II, Kpn I, Xba I, Sac I, Xho I, Hae III, Pvu II, Not I, Sst I, Bgl I)

Creating blunt ends (esim. lämpöstabiilit polymeraasit, Klenow Fragment DNA Polymerase I, Mung Bean nukleaasi)

Ligation (esim. T4 DNA Ligase, E. coli DNA Ligase, T4 RNA Ligase)

Phosphorylation (esim. T4 Polynucleotide Kinase)

Dephosphorylation (esim. CIAP, E. coli Alkaline Phosphatase, T4 Polynucleotide Kinase)

Nested deletions (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraasit, Exo III Nuclease, Mung Bean Nuclease)

2. cDNA:n syntetisointi ja kloonaus: (esim. Reverse Transcriptase, RNase H, DNA polymerase I, T4 DNA polymerase I, E. coli DNA Ligase)

3. Nukleiinihappojen leimaus:

5' leimaus (esim. T4 Polynucleotide Kinase)

3' addition (esim. T4 RNA Ligase)

- 3' fill-in (esim. Klenow Fragment DNA Polymerase I, T4 DNA Polymerase)
- 3' exchange (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraaasit)
- Nick-translation (esim. E. coli DNA Polymerase I, lämpösstäbiliit polymeraaasit)
- Replacement synthesis (esim. T4 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraaasit, Exo III Nuclease)
- Random priming (esim. Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraaasit)
- RNA probes (esim. T7 RNA Polymerase, SP6 RNA Polymerase)

#### 4. Nukleinihappojen sekventointi:

DNA:n sekventointi (esim. E. coli DNA Polymerase I, Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraaasit)

RNA:n sekventointi (esim. Reverse Transcriptase, lämpöstabiilit käänteistanskriptaasit)

#### 5. Nukleinihappojen mutagenointi:

Oligonucleotide directed (esim. T4 DNA Polymerase, T7 DNA Polymerase, lämpöstabiilit polymeraaasit)

Misincorporation (esim. Exo III Nuclease, Klenow Fragment DNA Polymerase I, lämpöstabiilit polymeraaasit)

#### 6. Mapping:

Restriction (esim. Exo III Nuclease)

Footprinting (esim. Exo III Nuclease)

Transcript (esim. Reverse Transcriptase, Mung Bean Nuclease)

#### 7. Nukleinihappojen (esim. DNA, RNA, mRNA, DNA/RNA koettiimet) puhdistaminen ja eristäminen

8. Analyyttiset menetelmät (esimerkkejä):**DNA Diagnostic Techniques:**

- DNA Mapping
- DNA sequencing
- Molecular analysis of point mutations
- Chromosome analysis
- DNA libraries
- DNA amplification methods (PCR, Inverse PCR, Ligase chain reaction (LCR), Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), Q beta replicase)
- Quantification of DNA/RNA
- Ribonuclease Protection Assay

**DNA diagnostics in Genetic disorders**

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- AFLP (Amplified Fragment Polymorphism)

**DNA diagnostics in Infections:**

- bacterial infections
- drug resistance of microorganisms
- epidemiology of infectious diseases

Other applications of DNA diagnostics:

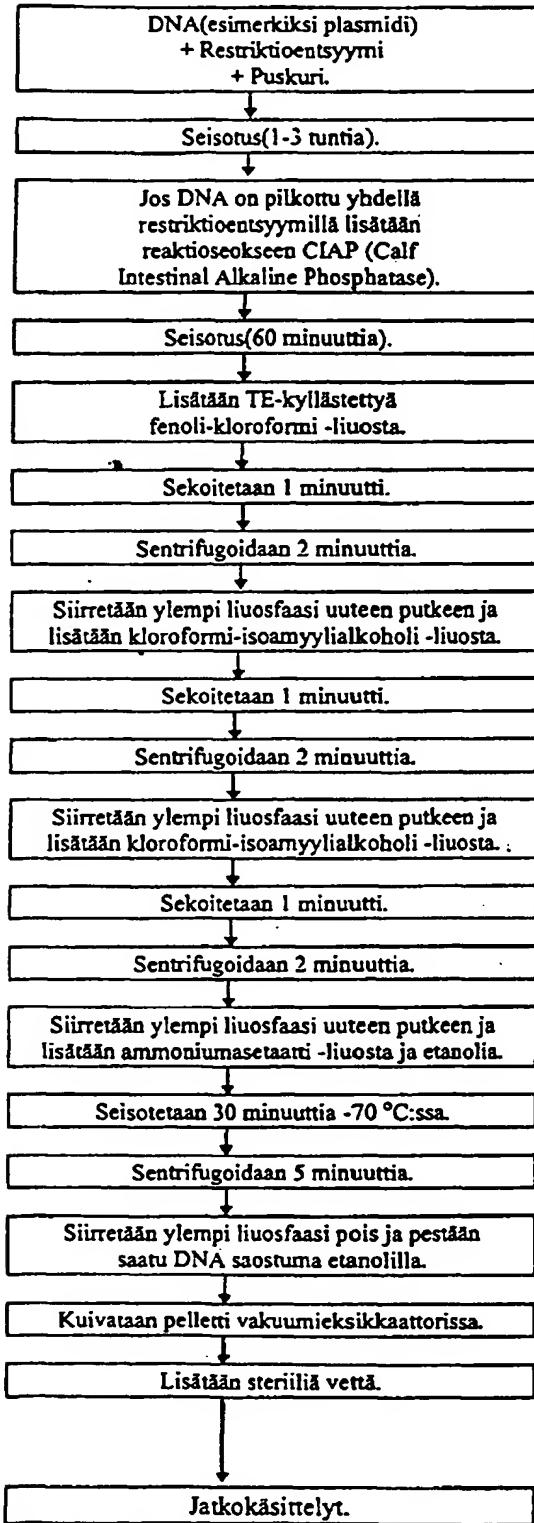
- forensic applications (DNA fingerprints)
- artificial chromosomes
- drug safety studies in molecular level

**Human Genome Project:**

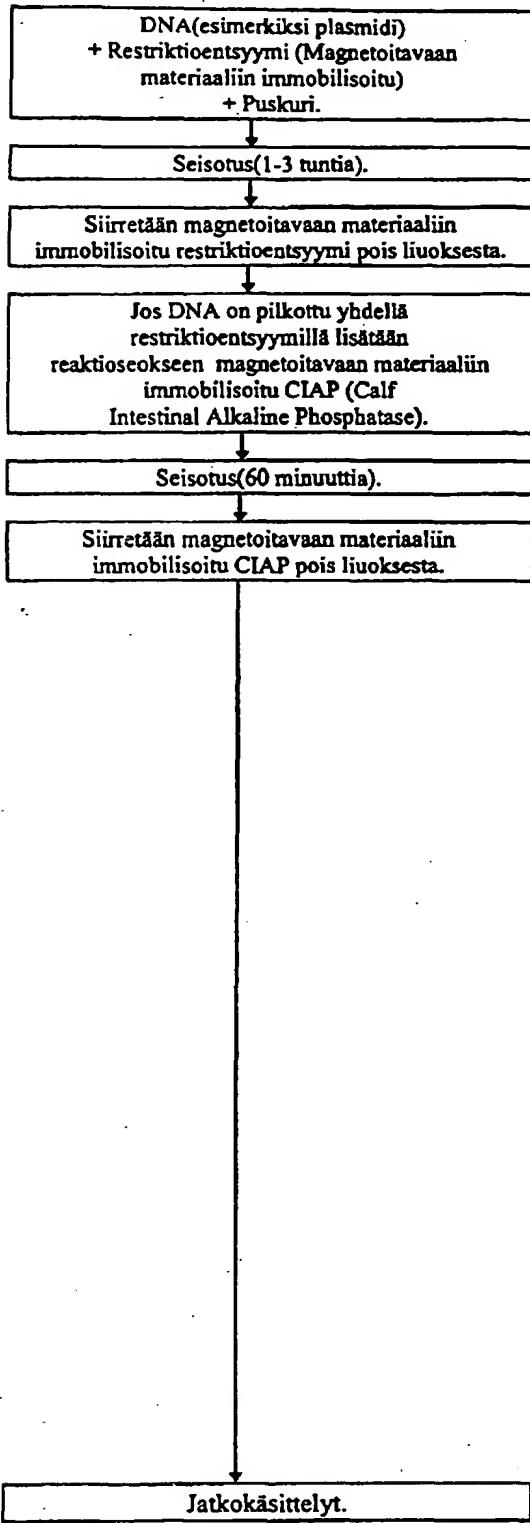
- mapping of chromosomes
- DNA sequencing
- mapping and sequencing of model organisms

Yllä mainitut keksinnön suoritusmuodot ovat vain esimerkkejä keksinnön mukaisen idean toteuttamisesta. Alan ammatti-miehelle on selvää, että keksinnön erilaiset suoritusmuodot voivat vaihdella jäljempänä esitettävien patenttivaatimusten puitteissa.

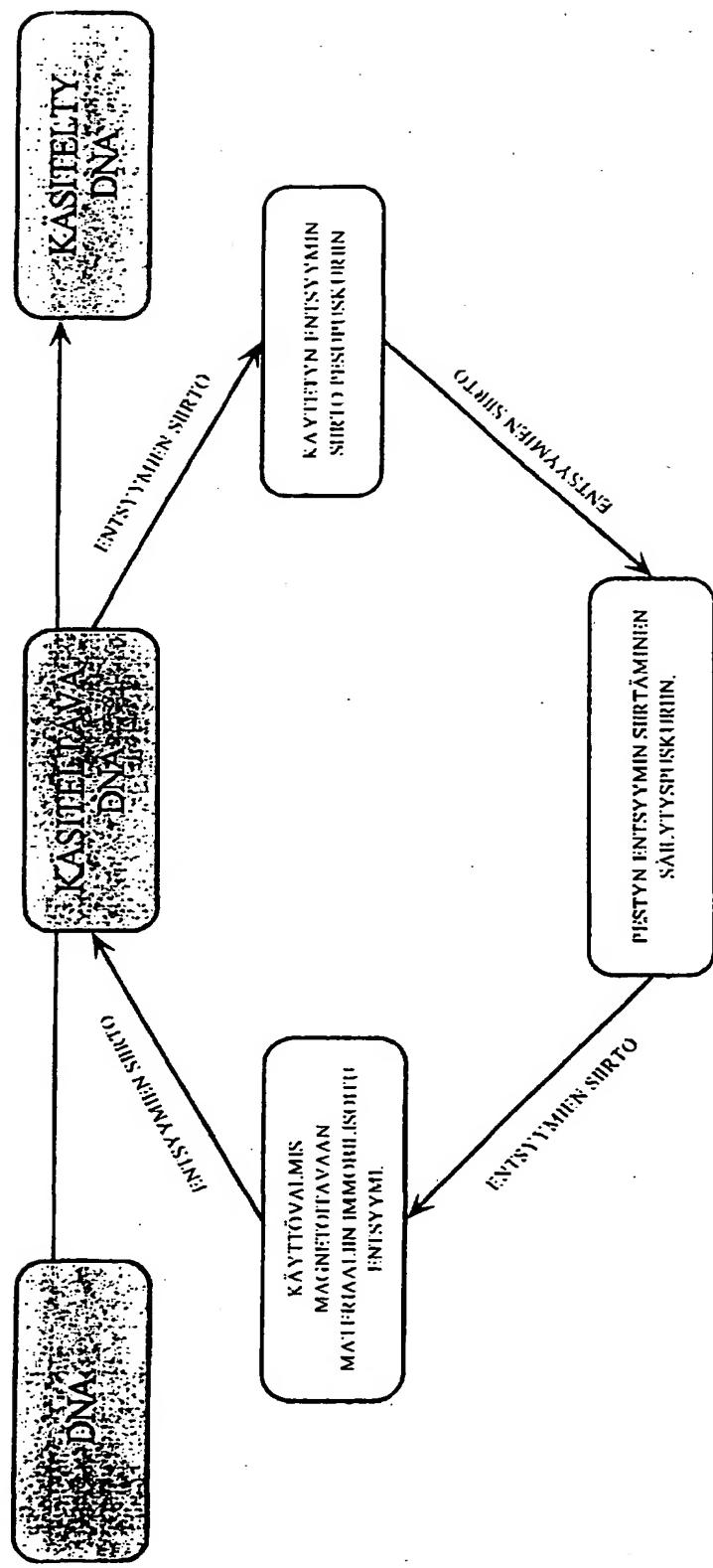
## PERINTEINEN MENETELMÄ



## UUSI MENETELMÄ



## KAAVIO 2



2000-333 333

## PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä mikropartikkeleihin immobilisoidun, erityisesti molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin tai nukleotidisekvenssin siirtämiseksi ensimmäisestä astiasta toiseen astiaan, jolloin
- 5 - mikropartikkeli ovat magneettista tai magnetisoitavissa olevaa materiaalia, tai mikropartikkeli on liitetty magneettiseen tai magnetisoitavissa olevaan kappaleeseen, ja - mikropartikkeli, joihin entsyyyi tai nukleotidisekvenssi on immobilisoitu, vangitaan ensimmäiseen astiaan upotetun
- 10 magneetin avulla, siirretään magneetti vangittuine mikropartikkeleineen toiseen astiaan, ja vapautetaan mikropartikkeli magneetin vaikutuksesta, tunnettu siitä, että magneetin pinta erotetaan mikropartikkeleista ohuen venyvän kalvon avulla.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneetti on kestomagneetti, joka lähennetään kalvoa kohti mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kalvoon, ja että kestomagneetti viedään kalvosta pois päin mikropartikkeleiden vapauttamiseksi.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneetti on sähkömagneetti, joka magnetisoidaan mikropartikkeleiden vangitsemiseksi kalvoon, ja että sähkömagneetin magneettikenttä poistetaan mikropartikkeleiden vapauttamiseksi.
- 25 4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkeli ovat superparamagneettisia partikkeleita.
- 30 5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkeli ovat paramagneettisia partikkeleita.
6. Jonkin patenttivastimuksesta 1 - 5 mukainen menetelmä,

tunnettu siitä, että entsyyymi on restriktioentsyyymi.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että entsyyymi on DNA/RNA:ta modifioiva entsyyymi.

5 8. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmän avulla otetaan entsyyymi talteen reaktioseoksesta.

9. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmän avulla siirretään entsyyymi 10 annosteluastiasta reaktioseokseen.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneettin avulla vangitut mikropartikkelit viedään pesunesteeseen ennen kuin ne viedään reaktioseokseen.

15 11. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että magneettisiin tai magnetoitavissa oleviin mikropartikkeleihin immobilisoitu entsyyymi tai nukleotidisekvenssi siirretään automaattiseen laitteeseen liitetyn siirtovälineen avulla.

20 12. Mikropartikkeleihin immobilisoidun molekyylibiologiassa käytettävän entsyymin annostelu- ja pesujärjestelmä, tunnettu siitä, että järjestelmä käsittää - levyn (30), jossa on reagenssikuoppia (31), jotka sisältävät valmiiksi annosteltavan määrän mikropartikkeleita,

25 joihin entsyymi on sidottu, ja mahdollisesti tarvittavat säilytysaineet, ja pesunestekuoppia (32), jotka sisältävät sopivan pesunesteen, johon reagenssikuopasta nostettu mikropartikkeli määrä on upotettavissa pesua varten ennen reaktioastiaan vientiä, sekä

30 - siirtovälineen (10), joka käsittää tangon (17), ja sen päässä olevan magneettin (18), sekä ohuen venyvän kalvon (21), joka erottaa magneettin (18) mikropartikkeleista,

mutta joka ei olennaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaa magneettikenttää.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen annostelu- ja pesujärjestelmä, tunnettu siitä, että se käsitteää pesunestekuoppia 5 (33), jotka sisältävät sopivan pesunesteen reaktioastiasta reaktion jälkeen siirrettävien mikropartikkelienv pesua varten ennen mikropartikkelienv vientiä jatkosäilytysastiaan (34).

14. Patenttivaatimuksen 12 tai 13 mukainen annostelu- ja 10 pesujärjestelmä, tunnettu siitä, että reagenskuopat (31) ja pesunestekuopat (32, 33) on järjestetty vierekkäisiin riveihin ja että mahdollinen jatkosäilytysastia (34) on yksittäisenä kuoppana levyllä.

15. Immobilisoitua molekyylibiologiassa käytettävä entsyy- 15 miä tai nukleotidisekvenssiä sitovien mikropartikkeleiden vangitsemiseen ja uudelleen vapauttamiseen soveltuva siirtoväline (10), tunnettu siitä, että se käsitteää tangon (17), ja sen päässä olevan magneetin (18), sekä ohuen venyvän kalvon (21), joka erottaa magneetin (18) mikropartikkeleista, mutta joka ei olennaisesti heikennä mikropartikkeleihin kohdistuvaa magneettikenttää.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen siirtoväline, tunnettu 25 siitä, että se käsitteää putkimaisessa runko-osassa (11) aksiaalisuunnassa edestakaisin liikuteltavissa olevan tangon (17), jonka kärjessä oleva magneetti (18) on kesto- magneetti, ja runko-osan (11) päässä olevan kärkikuvun (20), jonka kalvomaista pohjaa (21) vasten kestomagneetin pinta (22) on painettavissa, mikropartikkeleiden vangitse- 30 miseksi kalvomaiseen pohjaan (21), josta mikropartikkeli on irrotettavissa kun kestomagneettia (18) liikutetaan poispäin kalvomaisesta pohjasta (21).

17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen siirtoväline, tunnettu 35 siitä, että magneetti (18) on sähkömagneetti, jonka tangon

(17) kärjessä on ohut venyvä kalvo (21), ja että sähkömagnetti on magnetisoitavissa mikropartikkeleiden vangitsemissäksi kärkiosan kalvoon (21), josta mikropartikkeli on irrotettavissa, kun sähkömagneetin magneettikenttä poistetaan.

18. Menetelmä DNA:n pilkkomiseksi restriktioentsyymin avulla, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu restriktioentsyymi siirretään reaktioastiaan, jossa DNA:n pilkominen suoritetaan, ja että immobilisoitu restriktioentsyymi siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu modifioiva entsyymi, erityisesti proteinaasi K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), E. coli alkaline phosphatase, DNA ligaaasi, RNA ligaaasi, DNA polymeraasi, RNA polymeraasi tai nukleaasi siirretään reaktioastiaan, ja että immobilisoitu entsyymi siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

20. Menetelmä nukleotidisekvenssin, kuten DNA:n, RNA:n, mRNA:n tai cDNA:n, siirtämiseksi astiasta toiseen, tunnettu siitä, että mikropartikkeli, joihin nukleotidisekvenssi tulee sitoutumaan, siirretään reaktioastiaan, jossa nukleotidisekvenssi (DNA, RNA, mRNA tai cDNA) saatetaan sitoutumaan mikropartikkeleihin, ja mikropartikkeli siirretään pois reaktioastiasta halutun käsitellyajan jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

21. Menetelmä entsyymien inaktivoimiseksi Proteinaasi K:n avulla, tunnettu siitä, että mikropartikkeleihin immobilisoitu Proteinaasi K siirretään reaktioastiaan, jossa entsyymien inaktivoiminen suoritetaan, ja että immobilisoitu Proteinaasi K siirretään pois reaktioastiasta halutun reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

mällä.

22. Menetelmä molkyylibiologiassa käytettävien, mikropartikkeleihin immobilisoitujen restriktioentsyymien tai DNA/RNA:ta modifioivien entsyymien käyttämiseksi analyyti-  
5 siin menetelmiin, tunnettu siitä, että immobilisoidut entsyymit siirretään reaktioastiaan, jossa halutun reaktion annetaan tapahtua, ja immobilisoidut entsyymit siirretään pois reaktioastiasta reaktion jälkeen patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä.

8  
8  
3  
2  
8

## PATENTKRAV

1. En metod för att förflytta ett vid mikropartiklar immobiliseringat enzym, speciellt ett enzym som skall användas i molekylbiologin, eller en vid mikropartiklar immobiliseringad nukleotidsekvens, från ett kärl till ett annat kärl, varvid
  - mikropartiklarna består av ett material, som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, eller mikropartiklarna har fästats vid ett stycke som är magnetiskt eller som kan magnetiseras, och
  - mikropartiklarna, vid vilka enzymet eller nukleotidsekvensen immobiliseras, infångas med hjälp av en i det första käret nedsänkt magnet, magneten med de infångade mikropartiklarna förflyttas till det andra käret, och mikropartiklarna befrias från magnetfältets verkan kännetecknad av att magnetens yta åtskiljs från mikropartiklarna med hjälp av en tunn tänjbar membran.
- 15 2. En metod enligt patentkravet 1, kännetecknad av att magneten är en permanentmagnet, som förflyttas mot membranen för att infångा mikropartiklarna vid membranen, och att permanentmagneten förflyttas bort från membranen för att befria mikropartiklarna.
- 20 3. En metod enligt patentkravet 1, kännetecknad av att magneten är en elmagnet, som magnetiseras för att infångा mikropartiklarna vid membranen, och att elmagNETENS magnetfält avlägsnas för att befria mikropartiklarna.
- 25 4. En metod enligt patenkravet 1, 2 eller 3, kännetecknad av att mikropartiklarna är superparamagnetiska partiklar.
5. En metod enligt patenkravet 1, 2, eller 3, kännetecknad av att mikropartiklarna är paramagnetiska partiklar.

6. En metod enligt något av patenkraven 1 - 5, kännetecknad av att enzymet är ett restriktionsenzym.
7. En metod enligt något av patenkraven 1 - 5, kännetecknad av att enzymet är ett 5 enzym som modifierar DNA eller RNA.
8. En metod enligt något av de tidigare patenkraven, kännetecknad av att man med hjälp av metoden återvinner enzymet från en reaktionsblandning.
- 10 9. En metod enligt något av patenkraven 1 - 7, kännetecknad av att man med hjälp av metoden förflyttar enzymet från doseringskärlet till reaktionsblandningen.
- 15 10. En metod enligt patentkravet 9, kännetecknad av att mikropartiklarna, vilka man infängat med hjälp av magneten, förflyttas i en tvättvätska innan de förflyttas i reaktionsblandningen.
11. En metod enligt något av patentkraven 1 - 10, kännetecknad av att enzymet eller nukleotidsekvensen som immobiliseras vid mikropartiklar, som är magnetiska eller kan magnetiseras, förflyttas med ett överföringsmedel anslutet till en automatisk 20 anordning.
12. En anordning för dosering och tvättning av vid mikropartiklar immobilisera 25 en ordning som används i molekylbiologin, kännetecknad av att anordningen omfattar - en skiva (30) med reagensgropar (31), vilka innehåller en färdigt doserad mängd mikropartiklar, vid vilka enzymet är bundet, och eventuellt erforderliga konserveringsmedel, och tvättvätskegropar (32), som innehåller en lämplig tvättvätska, i vilken den från reagensgropen avlägsnade mikropartikelmängden kan doppas för tvätt innan den överförs till reaktionskärlet, och - ett överföringsmedel (10), som omfattar en stång (17), och en i ändan på denna 30 befintlig magnet (18), samt en tunn tänjbar membran (21), som skiljer magneten

(18) från mikropartiklarna, men som inte väsentligt försvagar magnetfältet som mikropartiklarna utsätts för.

13. En anordning för dosering och tvättning enligt patentkravet 12, kännetecknad av att den omfattar tvättvätskegropar (33), som innehåller en lämplig tvättvätska för tvättning av mikropartiklarna, som skall överföras från reaktionskärlet efter reaktionen, innan de förflyttas till ett förvaringskärl (34) för fortsatt bruk.

14. En anordning för dosering och tvättning enligt patentkravet 12 eller 13, kännetecknad av att reagensgroparna (31) och tvättvätskegroparna (32, 33) är ordnade i brevid varandra liggande rader och att ett eventuellt förvaringskärl (34) för fortsatt bruk utgör en enskild grop på skivan.

15. Ett överföringsmedel (10) för att infånga och befria mikropartiklar vid vilka ett enzym eller en nukleotidsekvens, som används vid molekylbiologin, immobiliseras kännetecknat av att det innehåller en stång (17), och en i ändan på denna befintlig magnet (18), och en tunn tänjbar membran (21), som skiljer magneten (18) från mikropartiklarna, men som inte väsentligt försvagar magnetfältet som mikropartiklarna utsätts för.

20

16. Ett överföringsmedel enligt patentkravet 15, kännetecknat av att det omfattar en i en rörformad kropp (11) befintlig stång (17), som kan förflyttas axiellt fram och tillbaka, och att magneten (18) i ändan på denna är en permanentmagnet, och en i ändan på kroppen (11) befintlig spetsbuk (20), mot vars membranliga botten (21) permanentmagneten yta (22) kan tryckas för att infånga mikropartiklarna vid den membranliga bottnen (21), från vilken mikropartiklarna kan lösgöras då permanentmagneten (18) förflyttas bort från den membranliga botten (21).

17. Ett överföringmedel enligt patenkravet 15, kännetecknat av att magneten (18) är en elmagnet, i ändan på vars stång (17) en tunn tänjbar membran (21) är belägen,

och att elmagneten kan magnetiseras för att infångा mikropartiklarna vid spetsdelens membran (21), från vilket mikropartiklarna kan lösgöras, då elmagnetens magnetfält avlägsnas.

5    18. En metod att klyva DNA med restriktionsenzymer, kännetecknad av att restriktionsenzymet immobiliseras vid mikropartiklarna förflyttas till reaktionskärlet, där klyvningen av DNA utförs, och att det immobiliseraade restriktionsenzymet förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.

10    19. En metod enligt patentkravet 18, kännetecknad av att det modifierande, vid mikropartiklarna immobiliseraade enzymet, speciellt proteinas K, CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), E. coli alkalisk fosfatas, DNA ligas, RNA ligas, DNA polymeras, RNA polymeras och nukleas, förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.

15    20. En metod för förflyttning av en nukleotidsekvens, såsom DNA, RNA, mRNA eller cDNA, från ett kärl till ett annat, kännetecknad av att mikropartiklarna, vid vilka nukleotidsekvensen kommer att fästas, överförs till ett reaktionskärl, där nukleotidsekvensen (DNA, RNA, mRNA eller cDNA) fästes till mikropartiklarna, och mikropartiklarna förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad behandlingstid medelst metoden enligt patentkravet 1.

20    21. En metod för inaktivering av enzymer med hjälp av Proteinas K, kännetecknad av att Proteinas K, som är immobiliseras vid mikropartiklarna, förflyttas till reaktionskärlet, där inaktiveringen av enzymerna utförs, och att immobiliseras Proteinas K förflyttas bort från reaktionskärlet efter önskad reaktion medelst metoden enligt patentkravet 1.

22. En metod för användning av vid mikropartiklar immobiliserade restriktionsenzymer eller DNA/RNA modifierande enzymer, som skall användas inom molekylbiologin, för analytiska metoder, kännetecknad av att de immobiliseraade enzymerna förflyttas till reaktionskärlet, där man låter den önskade 5 reaktionen ske, och de immobiliseraade enzymerna förflyttas bort från reaktionskärlet medelst metoden enligt patentkravet 1.

102906

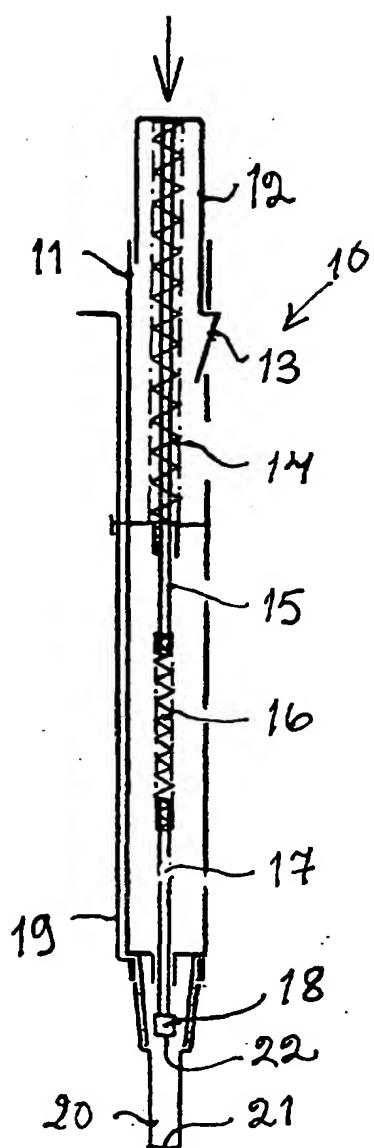


FIG. 1

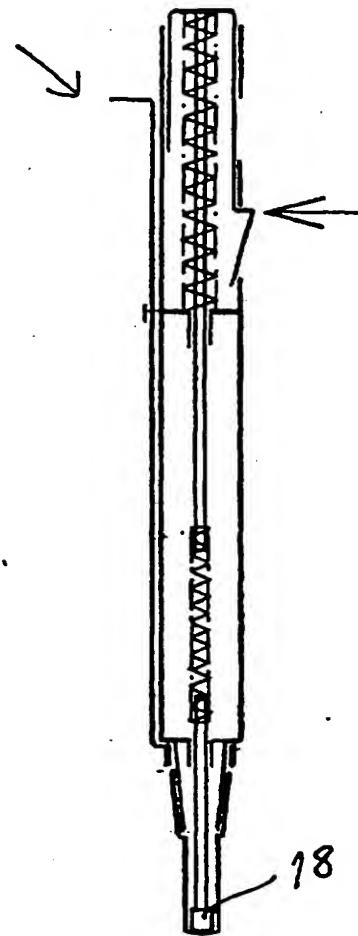


FIG. 2A

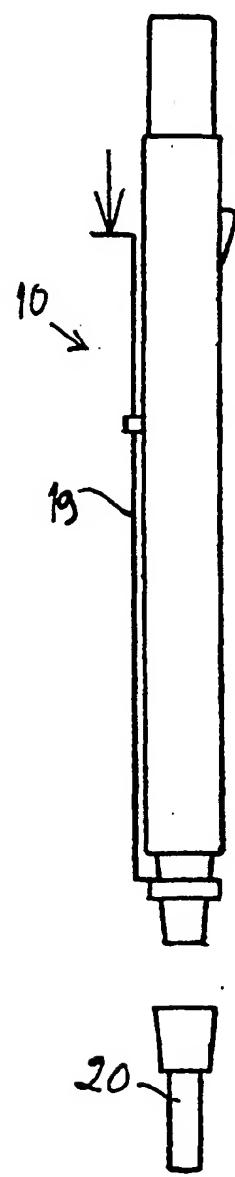


FIG. 3

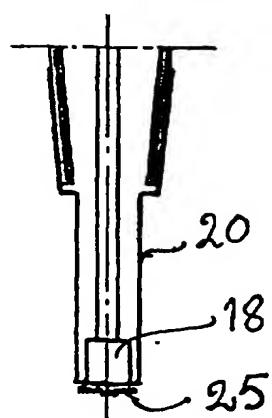


FIG. 2B

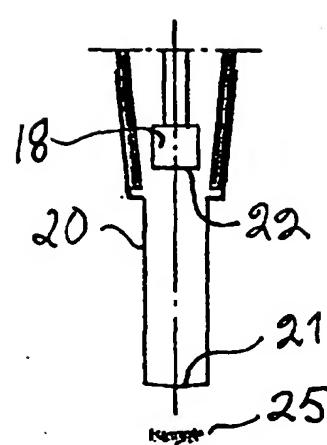


FIG. 2C

102906

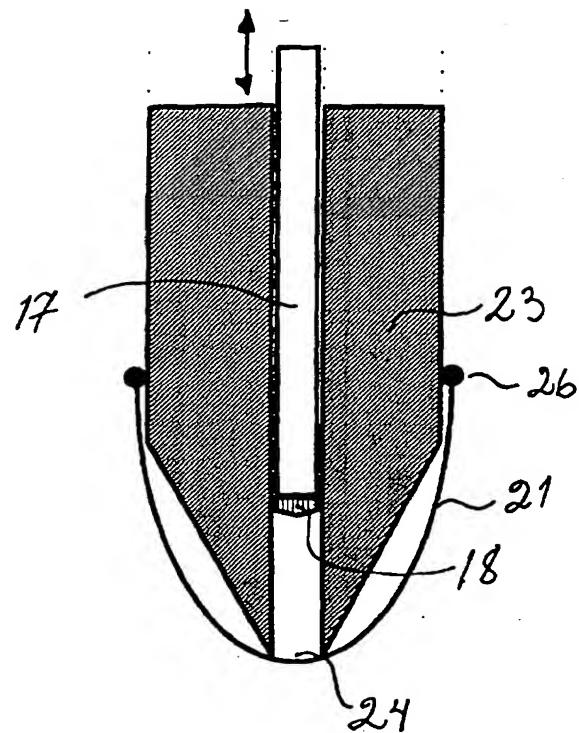


FIG. 4A

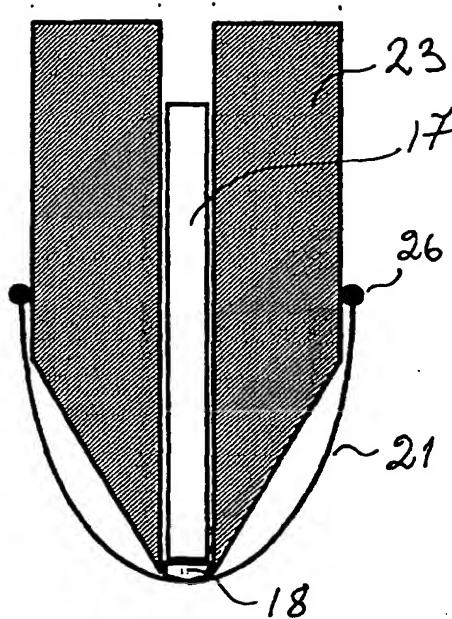


FIG. 4B

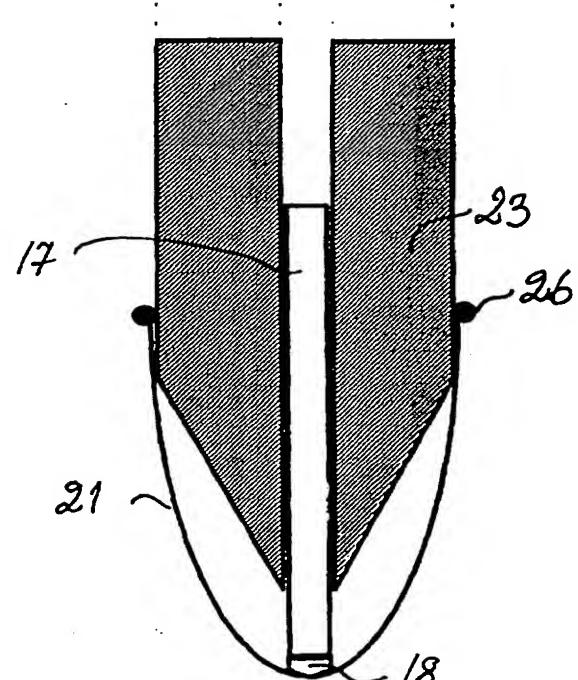


FIG. 4C

102906

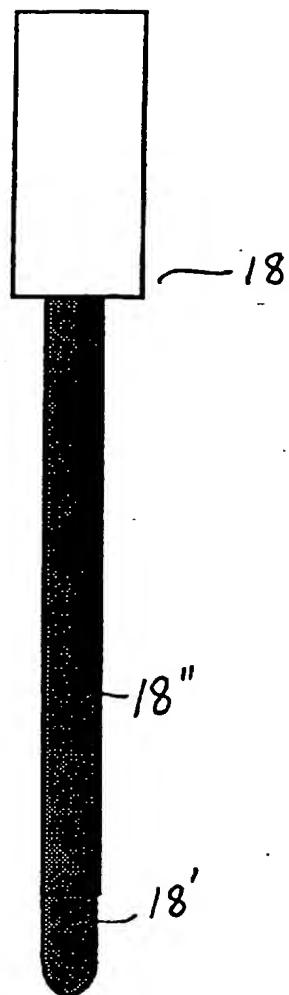


FIG. 5A

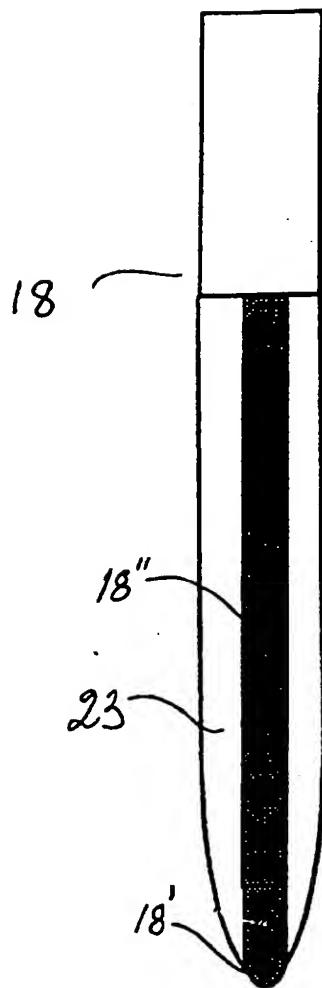


FIG. 5B

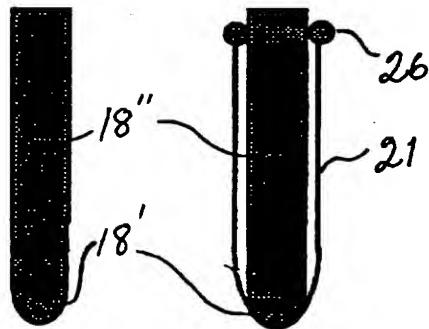


FIG. 5C



FIG. 5D

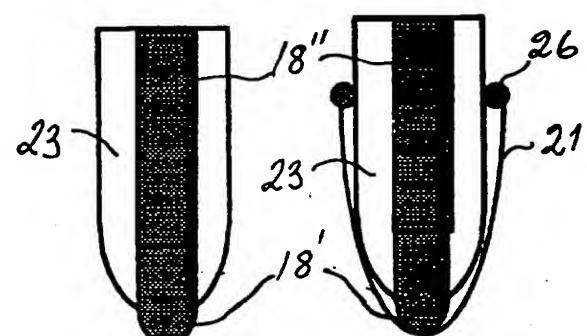


FIG. 5E

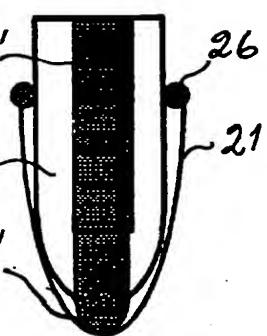


FIG. 5F

102906

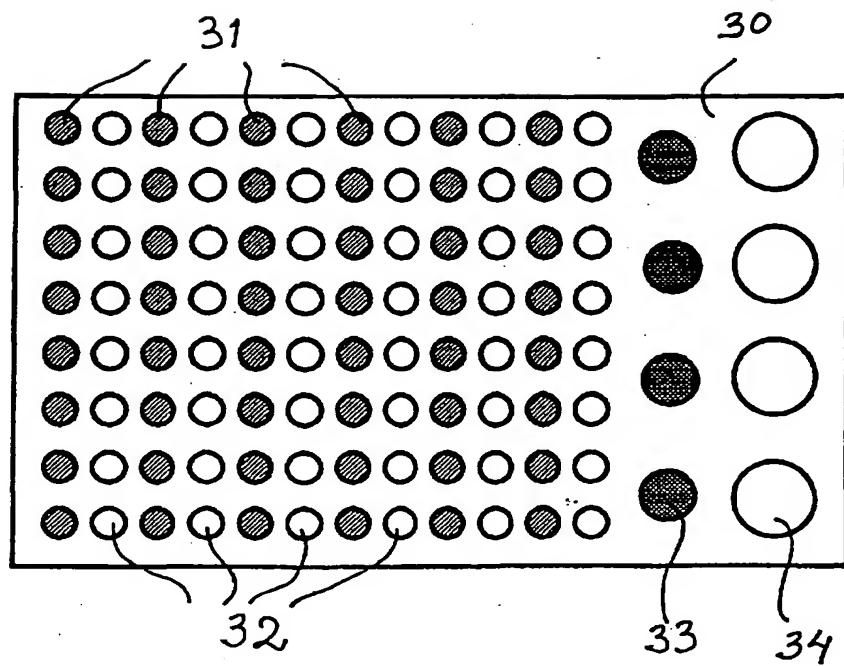


FIG. 6

6  
8  
8  
8  
8